

# 味噌熟成中のタンパク質の動態解析と麹菌に関する研究

著者	新國 佐幸
号	561
発行年	1996
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/16736">http://hdl.handle.net/10097/16736</a>

氏 名(本籍) 新<sup>にっ</sup> 國<sup>くに</sup> 佐<sup>さ</sup> 幸<sup>ゆき</sup>

学 位 の 種 類 博 士 (農 学)

学 位 記 番 号 農 第 5 6 1 号

学位授与年月日 平 成 9 年 1 月 9 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 味噌熟成中のタンパク質の動態解析と麹菌に関する研究

論文審査委員(主 査) 教 授 一 島 英 治  
教 授 神 尾 好 是  
教 授 前 忠 彦

# 論文内容要旨

## 序論

味噌はその使用する麴の原料の種類により、米味噌、麦味噌、豆味噌およびその他の味噌に分類される。そのうち米味噌は、味噌の生産量の約8割を占める代表的な味噌である。それは、主な原料を大豆、米および食塩とし、蒸煮大豆に米麴と食塩および水分調整のための種水を混合し容器に詰め、発酵・熟成させてつくられる。仕込みの際には、あらかじめ培養した酵母や乳酸菌が添加されることが多い。発酵・熟成の過程においては、原料に含まれるタンパク質、脂質、炭水化物等の諸成分は、麴の各種酵素により分解され、さらには、乳酸菌、酵母による発酵作用により、味噌らしい外観、物性、香味が醸成されてくる。

原料の大豆や米に含まれるタンパク質の分解については、その生成物が呈味成分として重要なので、水溶性窒素成分の側面からこれまでに研究されてきた。そして、タンパク質は麴の酵素により水溶性のアミノ酸、ペプチドに分解されることや、遊離アミノ酸組成や各種ペプチドの熟成中の変化が明らかにされている。また、米味噌(辛口)の熟成後には、水溶性窒素の全窒素に対する割合(タンパク溶解率)は約60%となることから、味噌の熟成度をあらわす指標のひとつとしてタンパク溶解率が用いられている。

しかしながら、仕込み直後の米味噌の約80%、製品味噌の約40%を占める水不溶性タンパク質の側面からの研究は、これまでほとんど行われていなかった。このため、味噌熟成中の動態について総合的なタンパク質分子からの知見の集積は不十分であった。近年では、核磁気共鳴装置(NMR)等の分析機器による食品中の分子、イオン等の存在状態に関する状態分析が進んでおり、味噌の発酵・熟成に関する研究の新しい手法として期待されている。

味噌の発酵・熟成中で原料タンパク質の分解を引き起こすのは、麴菌(*Aspergillus oryzae*)の酵素である。麴菌は、我が国においては清酒、味噌、醤油、食酢等の発酵食品の醸造に使用されている重要な菌類に属する微生物である。一方、麴菌は強力な発ガン物質であるアフラトキシンの生産菌 *A. flavus* や *A. parasiticus* などと分類学的には非常に類似の菌である。このため麴菌の分類学上の位置付けは、味噌製品の

安全性確保の観点からも求められている。近年、その塩基配列が良く保存されているところから、細菌の系統進化や分類・同定の研究には16SリボゾームRNA(rRNA)が用いられる様になってきた。ところが、この麴菌においては、まだその塩基配列は一部分しか明らかにされていない。

本研究は、味噌熟成中のタンパク質の動態を解析するにあたり、水不溶性タンパク質の側面からの観点も入れて、改めて熟成中の大豆タンパク質・米タンパク質の分解、大豆の蒸煮条件の味噌熟成中のタンパク質分解におよぼす影響、味噌の発酵・熟成に重要な“塩なれ”現象について解析し、明らかにしたものである。さらに、味噌熟成のスターターである麴菌ならびに近縁の菌種について、その18S rRNA遺伝子 (rDNA) の塩基配列を決定して系統進化樹を作製し、麴菌ならびに近縁菌類の系統進化の位置付けを明らかにしたものである。

## 第1章 味噌原料に含まれるタンパク質の発酵・熟成中の動態

### 1-1. 水不溶性タンパク質の蒸煮中の変化

味噌の水不溶性タンパク質は、水や食塩水ではほとんど抽出されないが、2% 2-メルカプトエタノール (ME)を含む2%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)溶液には、70%以上溶解した。蒸煮大豆の水不溶性画分を、MEを含むSDS溶液で抽出後、SDS-PAGEを行った結果、蒸煮大豆の全アセトン粉末と水不溶性画分の電気泳動パターンには大きな差は認められなかったことから、蒸煮後の大豆タンパク質の解析には、水不溶性画分からの検討も可能であることを明らかにした。また、未加熱の浸漬大豆と同じようなSDS-PAGEの電気泳動パターンは、蒸煮処理条件を強くするにつれて不明瞭にはなったが、120℃ 20分の蒸煮処理条件まで観察された(Fig.1)。同様な結果は、6 M 塩酸グアニジン (GuHCl)を用いるゲルろ過法でも得られた(Fig.2)。これらのことから、通常の大豆処理工程における蒸煮条件 (120℃では10~15分間) では、タンパク質の解析にSDS-PAGE法や 6 M GuHClを用いるゲルろ過法が適用できることを明らかにした。

### 1-2. 味噌熟成中の変化

麴歩合 (原料大豆の重量を10としたときの原料米の重量) 7, 食塩含量13%の米味噌

を試醸し、味噌熟成中のタンパク質をSDS-PAGEや 6 M GuHClによるゲルろ過により調べた。仕込み直後の味噌の電気泳動パターンやクロマトグラムは、蒸煮大豆のそれらとほぼ同様なパターンが観察された(Fig.3)。仕込み 1日後の電気泳動では、大豆タンパク質のサブユニットのバンドは薄くなり、または消失した。また、一方では、より電気泳動移動度の早い位置(より低分子)に新しいはっきりしないバンドが出現し、熟成日数とともに濃くなった。仕込み熟成10日以後は泳動パターンの変化は少なかった。このことから、大豆タンパク質の酵素分解は仕込み直後に急激に進み、その結果、熟成初期の水溶性の窒素成分が著しく増加することを明らかにした(Fig.4)。また、熟成後の水溶性画分には相対分子質量( $M_r$ )10K以上のタンパク質はほとんど認めない(Fig.5)が、本来のポリペプチド鎖が切断されて生成した $M_r$  5K~20Kのタンパク質が水不溶性成分として味噌中に存在することを明らかにした。

大豆タンパク質のサブユニットのバンドは味噌の発酵熟成中に消失する過程で、11Sの塩基性サブユニットに由来するバンド(Fig.3,B)は、薄くなりながらも熟成40日後まで観察されたことから、この塩基性サブユニットは、麹菌のタンパク分解酵素では分解されにくいことが見出された。

### 1-3. 蒸煮条件による影響

各温度で処理した大豆を用いて味噌を調製し、0.2 Mトリクロロ酢酸(TCA)可溶性窒素を調べた。25日後のTCA可溶性窒素は、仕込み直後と比べて全ての温度処理区で増加した(Fig.6)。25℃処理区の場合でもTCA可溶性窒素が増加したことから、未加熱の未変性大豆タンパク質でもある程度分解されるものと推定した。また、100℃10分処理区は90℃10分処理区と比べ、TCA可溶性窒素は熟成中著しく増加した(Fig.6)。100℃10分処理区は90℃10分処理区までの区とは明らかに区別されたことから、原料大豆の100℃処理区と90℃処理区では、大豆タンパク質の酵素による分解様式が異なるものと推定した。このため、各区からの味噌のアセトン粉末を調製して、味噌のタンパク質をSDS-PAGE法により調べた。加熱処理を行わない浸漬大豆を直接仕込み処理に用いた味噌では11Sタンパク質の酸性サブユニット、7Sタンパク質の $\alpha'$ 、 $\alpha$ -サブユニットが25日間の熟成中に消失し、新しい3本の明瞭なバンド (Fig.7,  $M_r$  23K, 25K, 42K)が出現した。未加熱の大豆タンパク質でも味噌仕込み処理により、大豆タンパク質は麹菌のタ

ンパク分解酵素により部分分解が行われていることを確認した。90℃10分処理により、7Sタンパク質の $\beta$ -サブユニットは熟成中に分解されたが、11Sタンパク質の塩基性サブユニットのバンド(Fig.7, B)は25日でも浸漬大豆のそれとほとんど変わらず、このサブユニットは90℃の加熱処理後でさえ、麴のタンパク分解酵素による加水分解作用に対して抵抗性を示した。100℃10分間の加熱処理では、塩基性サブユニットは熟成中ほとんど分解され、低分子のはっきりしない多くのバンドが出現した。この点、100℃で10分の加熱処理による大豆タンパク質の味噌熟成中の成分変化は、90℃以下の加熱処理とは明らかに異なった。この100℃の加熱処理区の電気泳動パターンは、10分間の大豆煮熟時間をさらに3時間まで延長しても、顕著な差は見られなかった(Fig.8)。以上により、大豆タンパク質の味噌熟成中の酵素による分解のためには100℃の温度を必要とするが、熱処理時間は10分間で充分であることを明らかにした。

しかしながら、100℃10分間の煮熟大豆で調製した味噌は、官能検査によるそのテクスチャーが100℃2時間や3時間処理区と比べ有意に劣るものであった(Table 1)。熟成味噌のテクスチャーの点からは、大豆の組織の軟化のためには100℃10分処理より強い条件、例えば100℃120分間あるいは100℃180分の熱処理を必要とすることを明らかとした。このため、味噌用の大豆蒸煮条件の設定には、熟成味噌のテクスチャーを考慮し大豆組織の軟化を指標とする必要があると結論した。これは、従来から行われていた蒸煮大豆の硬さを指標とした蒸煮条件の設定方法は合理的な方法であることを改めて確認するものとなった。

#### 1-4. 米タンパク質の発酵・熟成中の変化

通常の米味噌(辛口)の場合、麴歩合を7とすると、味噌に含まれるタンパク質の12%程度は米に由来することになる。そこで、米味噌製造における米タンパク質の発酵・熟成中の変化を調べた。

蒸米の蛋白溶解率は、0.3~0.4%と低いが、製麴工程により蛋白溶解率は10%程度まで上昇した。麴に水と食塩のみを加え発酵させた麴自己消化区とさらに蒸煮大豆をも加えた味噌区を調製しそのタンパク質を調べた。麴自己消化区の蛋白溶解率は味噌区のそれより低かった(Fig.9)ことから、米のタンパク質は、大豆のタンパク質に比べ、麴のタンパク分解酵素では分解されにくいことものと推定した。そこで、米タンパク

質の水不溶性画分のSDS-PAGEパターンを調べた。凍結乾燥した浸漬米区分と麴区分には、あまり差は見られなかった(Fig.10)。60日間発酵・熟成させた麴自己消化区には、顕著な  $M_r$  22K~23Kのグルテリンのバンドと、薄い26K, 37K, 39Kと57Kのバンドが認められた。これらのバンドはまた、大豆も加えた味噌区でも観察された(Fig.11)。このことにより、味噌の発酵・熟成中、米のタンパク質、特にグルテリンの22K~23Kのタンパク質は、麴のタンパク分解酵素では分解されにくいことが明らかとなった。

## 第2章 味噌熟成中の塩辛さと水溶性窒素

味噌の発酵・熟成とともに、同一食塩濃度でも塩辛さが減少するいわゆる “塩なれ” 現象が起こることを官能評価から確かめた(Table 2)。また、食塩濃度を一定にした味噌抽出液の $^{23}\text{Na}$ -NMRスペクトルの半値幅は熟成中増加し、水分活性値( $a_w$ )は減少することを認めた(Fig.12)。次に、グルコース、カザミノ酸、アルコールや乳酸の水溶性物質より成る味噌の抽出液のモデル溶液を調製し、保存後、熟成時間の経過がおよぼすNMRスペクトルの半値幅と水分活性値への影響を調べ、時間の経過は $^{23}\text{Na}$ -NMRスペクトルの半値幅および水分活性の値にほとんど影響しないことを認め、単なる時間の経過は、 $\text{Na}$ イオンや水分子の存在状態にほとんど影響を及ぼさないことを明らかにした(Fig.13)。 $^{23}\text{Na}$ -NMRスペクトルの半値幅は、グルコース、カザミノ酸等の水溶性物質の添加により増加した。また、味噌の発酵・熟成中、グルタミン酸等の水溶性物質は増加した(Fig.14)。これらの水溶性物質の添加は水分活性値を減少させることが知られている。塩辛さと $^{23}\text{Na}$ -NMRスペクトルの半値幅および水分活性値( $a_w$ )には、それぞれ、有意の相関が認められた(Fig.15)。

以上の結果から、単なる時間の経過は塩辛さの減少には影響されず、塩辛さの減少 “塩なれ” は、発酵熟成中のグルタミン酸等の水溶性物質の増加によるものであることを明らかにした。以上、味噌の塩なれ現象にとっては、発酵・熟成中の原料に含まれるタンパク質の酵素分解による呈味成分の生成が、極めて重要であることを改めて示した。

### 第3章 麴菌の系統的分類

#### 3-1. 麴菌ならびに近縁菌の18SリボゾームRNA遺伝子(rDNA)の塩基配列

麴菌の18S rDNAは、ゲノムDNAから直接PCR法により増幅し、*A. oryzae* ATCC 1011 と *A. flavus* NFRI 1212 の2菌株については、5'末端の約40塩基を除く1761塩基を決定した(Fig.16)。また*A. sojae* IF0 4386, *A. tamaraii* JCM 2259, *A. niger* IF0 6341, *A. awamori* IF0 4033および *A. parasiticus* NFRI 1153については、5'末端および3'末端のおよそ70塩基を除く1733の塩基配列を決定した。決定した1733塩基の18S rDNAの塩基配列は、*A. oryzae* ATCC 1011, *A. flavus* NFRI 1212, *A. sojae* IF0 4386, *A. parasiticus* NFRI 1153で全く同一であった(Table 3)。同様に、*A. awamori* IF0 4033 と *A. niger* IF0 6341の塩基配列も同一であった。以上のことから、保存度の高い遺伝子である18S rDNAの塩基配列は、これらのような極めて近縁な菌の間では、同一であることを明らかにした。一方、*A. oryzae* ATCC 1011の塩基配列と、*A. tamaraii* JCM 2259では1ヶ所の相違箇所を認めた。*A. oryzae* ATCC 1011と*A. niger* IF0 6341, *A. awamori* IF0 4033 の塩基配列との間には、11ヶ所の異なる箇所を認めた。また、決定した *A. oryzae* ATCC 1011 の約1700塩基の配列をすでに発表されている *S. cerevisiae* や *N. crassa* と比較するとそのアイデンティティーは、それぞれ88.1%と91.1%であった。このことから、菌類の場合も、18S rDNAの塩基配列は、細菌の場合と同様、最も基本となる遺伝情報の一つであることを明らかにした。

さらに、これらの菌株間の塩基配列の比較から進化距離を求め、系統樹を作製し(Fig.17)、麴菌とその近縁菌の系統進化の位置付けを明らかにした。

#### 3-2. 麴菌の18SrDNAの塩基配列を利用したネパールの米麴マナの主要菌の同定

ネパールで採取した米麴マナの微生物相を調べた結果、 $3.5 \times 10^7$  cfu/g の緑の胞子を有する糸状菌が検出された。そこで本糸状菌の同定に、分子生物学的手法の導入を試みた。マナから無作為に分離された本糸状菌5株の18S rDNAの部分配列は、*A. oryzae* や *A. flavus* のそれと一致していたことから、本菌は *A. oryzae* の近縁菌と推定された。さらに、メトレを有し、アフラトキシン生産性は全く認められず、抽出



・精製した5株の総DNAの制限酵素 *Sma*I による切断パターンは(Fig.18, 3kbp, 1.8kbp, 1kbpのバンド), *A. flavus* のそれとは(Fig.18, 4kbp, 1.8kbpのバンド)異なり, *A. oryzae* のそれ(Fig.18, 3kbp, 1.8kbp, 1kbpのバンド)と一致していたことから, 蒸米から調製されるネパールの米麴マナの主要な菌は *A. oryzae*であると同定した。以上のように, 分子生物学的手法を用いることにより醸造産業の利用菌株を比較的簡単に麴菌と同定できることを明らかにした。今後, 近縁の菌のrDNAのデータベースが充実され, この手法が一般化されることが期待される。

## 結論

味噌の発酵・熟成過程における原料に含まれるタンパク質の動態を水不溶性タンパク質の観点から解析した。大豆タンパク質のサブユニットの麴菌のタンパク分解酵素による分解は仕込み直後から急激に進み, その結果熟成初期の段階で水溶性の窒素成分が著しく増加することを明らかにした。また, 本来のポリペプチド鎖が切断されて生成した $M_r$  5K~20Kのタンパク質が, 水不溶性成分として熟成した味噌に存在することを明らかにした。

大豆の蒸煮条件が味噌熟成中のタンパク質の分解におよぼす影響を調べ, 大豆タンパク質の味噌熟成中の酵素による分解のためには, 100℃の温度を必要とするが, 時間は10分間で充分であることを明らかにした。しかしながら, 製品味噌の官能検査の結果から, 大豆の組織の軟化にはより強い条件を必要としたことから, 味噌用の大豆蒸煮条件の設定には, 大豆組織の軟化を指標とする必要があると結論した。これは従来から味噌製造現場において行われていた蒸煮大豆の硬さを指標とした蒸煮条件の設定方法が, 合理的な方法であることを改めて確認するものとなった。

一方, 米味噌中のタンパク質の約1割を占める米のタンパク質の味噌熟成中の動態を解析し, 米のタンパク質は, 大豆のタンパク質に比べ, 麴の酵素により分解されにくいことを明らかにした。特にグルテリンの塩基性サブユニットは, 麴菌のタンパク分解酵素では分解されにくいことを見出した。

味噌の発酵・熟成とともにいわゆる”塩なれ”が起こることを官能評価から確かめた。しかし, 単なる時間の経過と塩辛さの減少は結びつかないことが見出されたこと

から、味噌熟成中に見られた塩辛さと水分活性値の減少および $^{23}\text{Na}$ -NMRスペクトルの半値幅の増加は、発酵熟成中のグルタミン酸等の水溶性物質の増加によるものであることを明らかにした。以上、味噌の塩なれ現象にとっては、発酵・熟成中の原料に含まれるタンパク質の酵素分解による呈味成分の生成が、極めて重要であることを改めて示した。

味噌の発酵熟成中の原料タンパク質の分解を引き起こすのは、麹菌(*A. oryzae*)の酵素である。麹菌は、我が国においては清酒、味噌、醤油、食酢等の日本の特色ある発酵食品の醸造に使用されている重要な菌である。一方、麹菌の近縁菌には強い発ガン物質であるアフラトキシンの生産菌 *A. flavus* や *A. parasiticus*があり、麹菌とこれらの近縁菌はに類似した分類学的位置を与えられている。そこで、麹菌ならびに近縁菌について、18S rDNAの約1700の塩基配列を決定し、さらに、これらの菌株間の塩基配列の比較から系統樹を作製し、麹菌とその近縁菌の系統進化の位置付けを明らかにした。さらに、18S rDNAの塩基配列等の分子生物学的手法を用いることにより未知の菌株を麹菌と比較的に簡単に同定できることを明らかにした。

#### 原著論文

- 1) S. Nikkuni, H. Itoh, M. Tanaka and T. Ohta (1984) Changes in SDS Polyacrylamide Gel Electrophoretic Pattern of Water-insoluble Fraction during Miso Fermentation.  
*Nippon Shokuhinkogyo Gakkaishi*, 31, 502-510.
- 2) S. Nikkuni, N. Okada and H. Itoh (1988) Effect of Soybean Cooking Temperature on the Texture and Protein Digestability of Miso.  
*J. Food Sci.*, 53, 445-449.
- 3) 新国佐幸, 岡田憲幸, 伊藤 寛 (1987) 大豆の蒸煮条件と味噌不溶性画分のSDS電気泳動パターン.  
日食工誌, 34, 731-737.
- 4) 新国佐幸, 石山朋治, 鈴木チセ (1991) 味噌の発酵・熟成中における米蛋白質の分解.  
日食工誌, 38, 316-322.
- 5) S. Nikkuni, T. Kurosawa and N. Ishida (1996) Changes in  $^{23}\text{Na}$  NMR Signal, Water Activity and Saltiness of Miso during Fermentation.  
*Food Sci. Technol., Int.*, 2, 127-130.
- 6) S. Nikkuni, N. Kosaka, C. Suzuki and K. Mori (1996) Comparative Sequence Analysis on the 18S rRNA Gene of *Aspergillus oryzae*, *A. sojae*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *A. awamori* and *A. tamarii*.  
*J. Gen. Appl. Microbiol.*, 42, 181-187.
- 7) S. Nikkuni, T. B. Karki, T. Terao and C. Suzuki (1996) Microflora of Mana, a Nepalese Rice Koji.  
*J. Ferment. Bioeng.*, 81, 168-170.

#### 参考論文

- 1) S. Nikkuni, T. B. Karki, K. S. Vilku, T. Suzuki, K. Shindoh and C. Suzuki (1995) Mineral and Amino Acid Contents of Kinema, a Fermented Soybean Food Prepared in Nepal.

- Food Sci. Technol., Int.*, 1, 107-111.
- 2) 新国佐幸, 伊藤 寛, 高木 仁, 鈴木忠直, 海老根英雄 (1981) 大豆煮汁の利用.  
日食工誌, 26, 248-255.
  - 3) 新国佐幸, 石山朋治, 鈴木チセ, 鈴木忠直 (1996) ヘテロ乳酸菌 *Lactobacillus fructivorans* に起因する低食塩加工味噌の膨れ.  
食科工誌, 43(8), 810-816.
  - 4) C. Suzuki, K. Yamada, N. Okada and S. Nikkuni (1989) Isolation and Characterization of Halotolerant Killer Yeasts from Fermented Foods.  
*Agric. Biol. Chem.*, 53, 2539-2597.
  - 5) C. Suzuki and S. Nikkuni (1989) Purification and Properties of the Killer Toxin Produced by a Halotolerant Killer Yeast, *Pichia farinosa*.  
*Agric. Biol. Chem.*, 53, 2599-2604.
  - 6) C. Suzuki and S. Nikkuni (1994) The Primary and Subunit Structure of a Novel Type Killer Toxin Produced by a Halotolerant Yeast, *Pichia farinosa*.  
*J. Biol. Chem.*, 269, 3041-3046.
  - 7) 三輪昭生, 伊藤 寛, 新国佐幸 (1992) 耐塩性キラ酵母 *Debaryomyces hansenii* TK-5のキラー毒素の生産性と安定化.  
醸協, 87, 521-526.
  - 8) 岡田憲幸, 新国佐幸, 真鍋 勝 (1991) 納豆菌の細胞融合ーコロニーカウントによる融合の証明ー.  
日食工誌, 38, 79-85.
  - 9) 岡田憲幸, 塚本チセ, 新国佐幸, 真鍋 勝 (1989) *Bacillus subtilis* および *B. megaterium*を用いる同種間細胞融合ープロトプラスト再生培地におけるコロニー出現と高張剤濃度ー.  
食総研報, No. 53, 10-16.
  - 10) 岡田憲幸, 塚本チセ, 新国佐幸, 真鍋 勝 (1989) バチルス属栄養要求変異株のプロトプラスト再生培地におけるマーカー発現.  
食総研報, No. 53, 17-22.

- 11) S. -C. Chae, H. Itoh, S. Nikkuni (1989) Effect of Soy Sauce Koji and Commercial Proteolytic Enzyme on the Acceleration of Fish Sauce Production.  
*Korean J. Food Sci. Technol.*, 21, 639-648.
- 12) S. -C. Chae, H. Itoh, S. Nikkuni (1989) The Color Measurement and Sensory Evaluation for the Accelerated Fish Sauce Products.  
*Korean J. Food Sci. Technol.*, 21, 649-654.
- 13) 藤井建夫, 新国佐幸, 飯田 遥 (1992) 市販しょっつるの化学成分と腐敗性.  
日食工誌, 39, 702-706.
- 14) T. Karki, H. Itoh, S. Nikkuni and M. Kozaki (1986) Improvement of Gundruk Processing by Selected Lactic Strains.  
*Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 33, 734-739.
- 15) H. Itoh. R. S. Hadioetomo, S. Nikkuni and N. Okada (1985) Studies on Lactic Acid Bacteria in Fish Sauces. (Part 1) Chemical Composition and Microflora of Fish Sauces.  
*Rept. Natl. Food. Res. Inst.* No. 47, 31-40.
- 16) H. Itoh. R. S. Hadioetomo, S. Nikkuni and N. Okada (1985) Studies on Lactic Acid Bacteria in Fish Sauces. (Part 2) Identification of Salt-tolerant and Acid Producing Bacteria from Fish Sauces.  
*Rept. Natl. Food. Res. Inst.* No. 47, 41-48.
- 17) 伊藤 寛, 岡田憲幸, 新国佐幸, 伊藤俊洋, 金子 弘 (1987) 魚醤油の乳酸菌の研究 (第3報) 好塩菌の脂肪酸および脂質組成.  
日本醤油研究所報告雑誌, 13, 103-110.
- 18) N. Okada, R. S. Hadioetimo, S. Nikkuni, K. Katoh and T. Ohta (1983) Vitamin B<sub>12</sub> Content of Fermented Food in the Tropics.  
*Rept. Natl. Food. Res. Inst.* No. 43, 126-129.
- 19) N. Okada, R. S. Hadioetimo, S. Nikkuni and H. Itoh (1985) Isolation of Vitamin B<sub>12</sub> Producing Bacteria from Fermented Soybean Tempeh of Indonesia.

*Rept. Natl. Food. Res. Inst.* No. 46, 15-20.

- 20) T. Karki, H. Itoh, S. Nikkuni, M. Ohno and H. Ebine (1983) Micoorganisms Associated with Various Pickles.

*Rept. Natl. Food. Res. Inst.* No. 43, 40-53.

- 21) 渡辺敦夫, 大谷敏郎, 新国佐幸, 馬場 透, 太田輝夫 (1982) 限外ろ過法による納豆廃水処理の効果.

日食工誌, 29, 245-249.

- 22) 渡辺敦夫, 大谷敏郎, 新国佐幸, 馬場 透, 太田輝夫 (1982) 納豆廃水処理における限外ろ過条件の検討.

日食工誌, 29, 250-254.

- 23) 大谷敏郎, 新国佐幸, 星野智巻, 鍋谷浩志, 渡辺敦夫 (1985) 食品加工場における廃水・廃棄物処理に要するエネルギー 第2報, 味噌工場.

食総研報, No. 46, 67-72.

- 24) C. S. Ng, Y. N. Chin, P. Y. Lim, C. E. Tan, S. E. Yeap, S. Nikkuni and M. Bito (1983) Changes in Quality of White Pomfret, Chinese Pomfret and Grouper during Ice-storage.

*Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 49, 769-775.

- 25) C. S. Ng, P. Y. Lim, Y. N. Chin, S. Nikkuni and M. Bito (1982) Studies on Quality Assessment of Frozen Fish I. The Correlation Between Extractability or Viscosity and the Amount of Drip in Frozen White Pomfret.

*Refrigeration*, 57(10), 23-26 .

- 26) C. S. Ng, P. Y. Lim, Y. N. Chin, S. Nikkuni and M. Bito (1982) Studies on Quality Assessment of Frozen Fish II. K-Value, Volatile Base and Trimethylamin-Nitrogen as Freshness Indices, and Peroxide Value and Thiobarbituric Acid Number in Rancidity of Skin Portion.

*Refrigeration*, 57(12), 1-7.

- 27) H. Itoh, R. Yoshida, T. Mizuno, M. Kudo, S. Nikkuni and T. Karki (1984) Study on the Contents of Volatile Isothiocyanate of Cultivars of

*Brassica* Vegetables.

*Rept. Natl. Food Res. Inst.*, No. 45, 33-41.

- 28) H. Itoh, M. Yano, N. Okada and S. Nikkuni (1985) Study on Volatile Isothiocyanate Detected in Cultivar of *Brassica* Vegetable. (Part 2) Analysis of Flavour of Cabbage by Gaschromatography Mass spectrometry. *Rept. Natl. Food Res. Inst.*, No. 47, 41-48.
- 29) 木内 幹, 森 隆, 新国佐幸 (1984) 酵母添加仕込み味噌の微生物. 食総研報, No.45, 14-18.
- 30) E. Ichishima, A. Yamane, T. Nitta, M. Kinoshita, S. Nikkuni, T. Oka and S. Yokoyama (1973) Production of a New Type of Acid Carboxypeptidase of Molds of *Aspergillus niger* Group. *Appl. Microbiol.*, 26, 327-331.

#### 参考総説

- 1) 新国佐幸 (1989) 味噌熟成中の大豆蛋白質の分解. 醸協, 84, 216-221.
- 2) 小川紀男, 新国佐幸 (1989) 味噌の成分から官能的品質を理解するために. 醸協, 84, 763-769 .
- 3) 新国佐幸 (1992) 味噌用大豆の加工適性. 食糧(農林水産省食品総合研究所) No. 30, 141-151.
- 4) 新国佐幸, 鈴木チセ (1990) 耐塩性キラー酵母. バイオサイエンスとインダストリー, 48, 449-451.
- 5) 新国佐幸 (1989) 発酵食品関連微生物の最近の話題. 農林水産技術研究ジャーナル(農林水産技術情報協会), 12(1), 48-58.
- 6) 新国佐幸 (1989) 発酵食品にかかわる微生物の最近の動き. 食品流通技術(流通システム研究センター), 18, 13-17.
- 7) 新国佐幸 (1993) 味噌製造とバイオテクノロジー. 農林水産技術研究ジャーナル(農林水産技術情報協会), 16( 7 ), 14-18.
- 8) 新国佐幸 (1994) 味噌醸造微生物の最近の話題.

醸協, 86, 119-125.

- 9) 新国佐幸 (1989) ネパールの麴「マーチャ」と大豆発酵食品「キネマ」.  
化学と生物, 27, 824-828.

- 10) 新国佐幸 (1993) ネパールの発酵食品: マーチャとキネマ.  
日本醤油研究所雑誌, 19, 249-255.

参考単行本 (分担執筆)

- 1) 新国佐幸 (1987) 味噌, 醤油, 食酢, 納豆, テンペ.  
食品分析法文献資料集 (農林水産省農林水産技術会議事務局・食品分析法  
に関する研究会編, 光琳発行), p.163-189.
- 2) 新国佐幸 (1989) 味噌・醤油.  
食品流通技術ハンドブック (恒星社厚生閣), p.721-731.
- 3) 新国佐幸 (1995) 発酵食品.  
米の科学 (朝倉書店), p.176-183.
- 4) 新国佐幸 (1988) 麴菌, 糸状菌, 味噌.  
フーズバイオテクノロジー事典 (産業調査会出版センター), p.232-233,  
p.226-227, p.262-263.
- 5) 新国佐幸 (1993) 醸造・発酵食品生産における微生物バイオテクノロジー, 味噌.  
農林水産研究文献解題食品微生物バイオテクノロジー (農林水産省農林水産技術会  
議事務局), p.208-223.
- 6) 新国佐幸 (1988) 農水産物の品質評価技術①大豆発酵食品.  
農林水産研究文献解題流通利用編 (農林水産省農林水産技術会議事務局),  
p.81-87.
- 7) 新国佐幸 (1988) 農水産物の品質保持・流通技術 ①大豆発酵食品.  
農林水産研究文献解題流通利用編 (農林水産省農林水産技術会議事務局),  
p.192-196.
- 8) 新国佐幸 (1988) 農水産物の加工利用技術①大豆発酵食品.  
農林水産研究文献解題流通利用編 (農林水産省農林水産技術会議事務局),  
p.289-293.



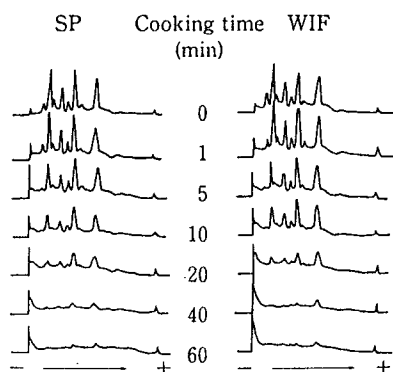


Fig. 1 SDS-PAGE patterns of autoclaved soybean proteins which were solubilized with SDS solution containing 2-mercaptoetanol.

SP, acetone powders of whole soybeans autoclaved at 1 kg/cm<sup>2</sup> steam pressure; WIF, acetone powders of water-insoluble fractions prepared from autoclaved soybeans. The sample of 0 min represents to soaked soybeans.

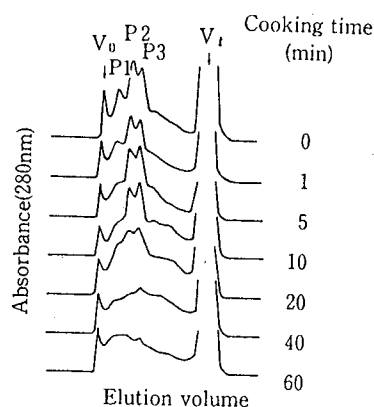


Fig. 2 Elution patterns of autoclaved soybean proteins which were solubilized with GuHCl solution containing dithiothreitol from a Sepharose 6B column.

The column (1.6 cm x 90 cm) of Sepharose 6B was equilibrated with 6M GuHCl. Elution was performed with the same solution at 4 ml/hr.

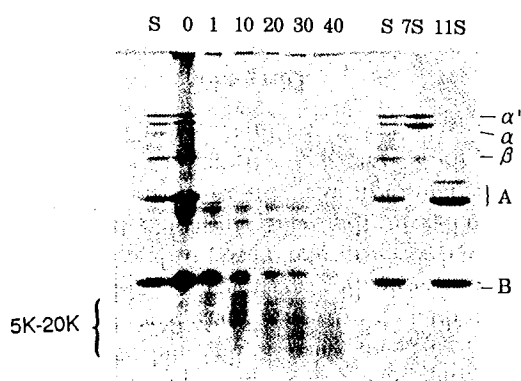


Fig. 3 SDS-PAGE patterns of proteins solubilized with 2% SDS containing 2-ME from water-insoluble fractions of miso during fermentation.

Lanes: S, uncooked soybean; 0-40, water-insoluble proteins of the miso sample after 0 day, 1 day, 10 days, 20 days, 30 days and 40 days; 7S, 7S globulin; 11S, 11S globulin. Labels of "5K-20K" at the left edge are the estimated relative molecular masses of the newly formed bands. Labels at the right edge were as follows: A and B, acidic and basic subunits of 11S globulin, respectively;  $\alpha$ ,  $\alpha'$  and  $\beta$ -subunits of 7S globulin.

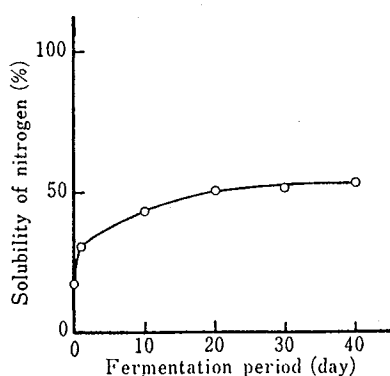


Fig. 4 Time-course of solubility of nitrogen of miso during fermentation.

Solubility of nitrogen(%)=WN/TN X 100. WN, water-soluble nitrogen content; TN, total nitrogen content.

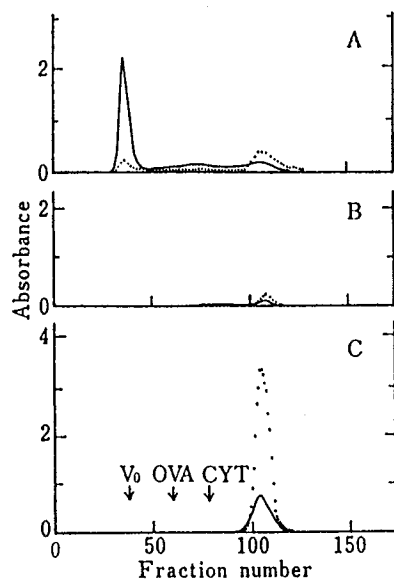


Fig. 5 Elution patterns of water-soluble fraction of miso during fermentation from a Sephadex G-100 column.

The column (2.6 x 95 cm) of Sephadex G-100 was equilibrated with 0.05M potassium phosphate buffer (pH 6.0). Elution was performed with the same buffer at the flow rated of 20 ml/hr.

A, uncooked soybean; B, 0-day miso, that is, immediately after mixing cooked soybeans, koji and salt; C, miso after 40 days of fermentation;  $V_0$ , elution volume of blue dextran; OVA, elution volume of ovalbumin; CYT, elution volume of cytochrome c; ---, absorbance at 570 nm after ninhydrin reaction; —, absorbance at 750 nm by Lowry method.

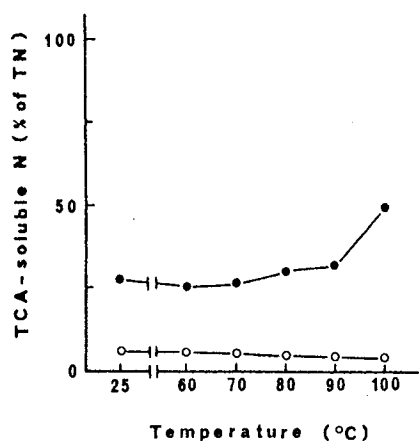


Fig. 6 TCA-soluble nitrogen contents of miso samples prepared with soybeans cooked at temperatures indicated in this figure after 0 day (○) and 25 days (●) of fermentation.

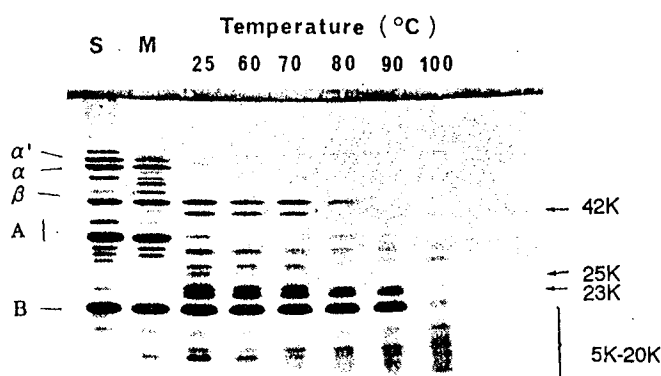


Fig. 7 SDS-PAGE patterns showing the effect of cooking temperature of soybeans on protein digestibility with koji enzymes during miso fermentation.

Miso samples were prepared with soybeans cooked at temperatures indicated in this figure and fermented for 25 days. Patterns: S, soaked soybeans; M, soaked soybeans containing 12% salt and incubated for 25 days. Labels of "5K-42K" at the right edge are the estimated molecular masses of the newly formed bands. Labels at the left edge were as follows: A and B, acidic and basic subunits of 11S globulin, respectively;  $\alpha$ ,  $\alpha'$  and  $\beta$ -subunits of 7S globulin.

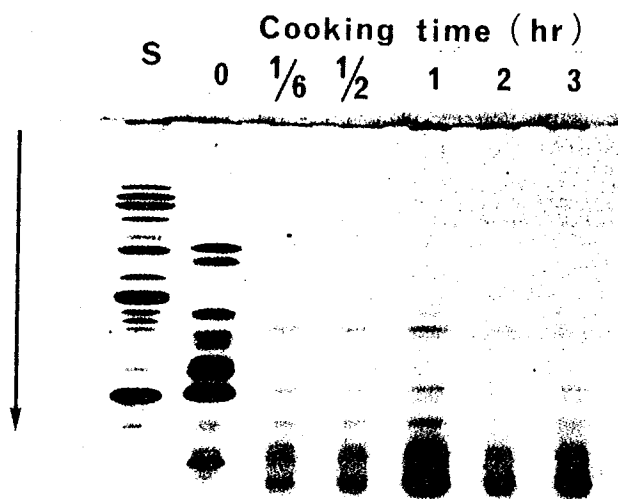


Fig. 8 SDS-PAGE patterns showing the effect of the cooking time of soybeans at 100°C on protein digestibility during 40 days of miso fermentation.

S, soaked soybean.

Table 1 Mean sensory scores for texture of miso samples.

Soybeans cooking time (min)	Sensory score <sup>a</sup>
10	3.0 <sup>b</sup>
30	2.4 <sup>c</sup>
60	2.1 <sup>d</sup>
120	1.5 <sup>e</sup>
180	1.3 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Values represent the mean of scores (n=18). 1=good (smooth); 2=intermediate; 3=bad (coarse).

<sup>b-e</sup> Means not having the same superscript are significantly different (p<0.05).

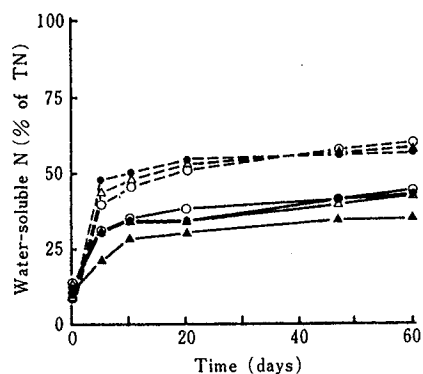


Fig. 9 Time-courses of water-soluble nitrogen contents during fermentation.

Samples were incubated at 30°C. —, mixtures of salt, water and rice-koji prepared with the Sasanishiki variety sample (○), the Koshihikari variety sample (△), the Nihonbare variety sample (●) and the Tayoto-riyo sample (▲). ---, miso sample prepared with the Koshihikari variety sample and soybeans. The weight ratios of rice to soybean (10) were 4(○), 7(△) and 20(●).

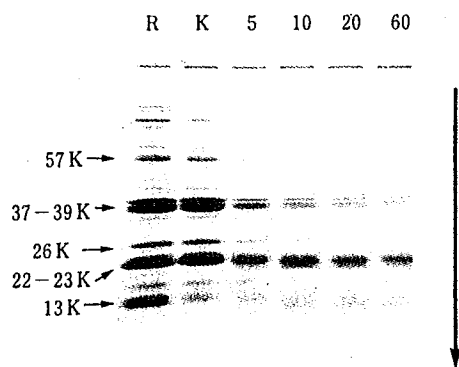


Fig. 10 SDS-PAGE patterns of the rice sample and the water-insoluble fraction of the mixtures (koji prepared with the same rice sample, salt and water) during 60 days of fermentation at 30°C.

Lanes: R, the lyophilized Koshihikari variety rice sample; K, the water-insoluble fraction of the koji prepared with the Koshihikari variety sample, 5-60, the mixture (koji, salt and water) fermented for 5 days to 60 days, respectively. Labels of "13K-57K" at left edge of the gel are estimated relative molecular masses.

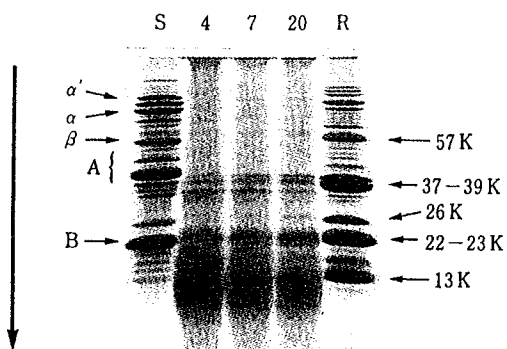


Fig. 11 SDS-PAGE patterns of miso samples after 60 days of fermentation.

Lanes: S, the lyophilized soaked soybeans; R, the lyophilized Koshihikari variety rice sample; 4, 7 and 20, the water-insoluble fraction of the miso sample whose ratio of the rice to the soybeans was 4, 7 and 20, respectively. Labels of "13K-57K" at the right edge of the gel are estimated relative molecular masses. Labels at the left edge of the gel are as follows:  $\alpha'$ ,  $\alpha$  and  $\beta$ , subunits of 7S globulin; A, acidic subunits of 11S globulin; B, basic subunits of 11S globulin.

Table 2 Evaluated NaCl concentrations of miso extracts during fermentation by sensory test.

Fermentation time (days)	Evaluated NaCl concentration* (%)
0	1.04 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>
10	0.95 $\pm$ 0.20 <sup>a, b</sup>
50	0.90 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>
112	0.86 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>

The miso extracts containing 1.2% NaCl were evaluated their NaCl concentrations sensorily in a comparison of standard series of NaCl solutions by a panel of 10 members.

\* mean  $\pm$  s.d. (n=10).

<sup>a, b</sup> Means not having the same superscript are significantly different ( $p < 0.05$ ).

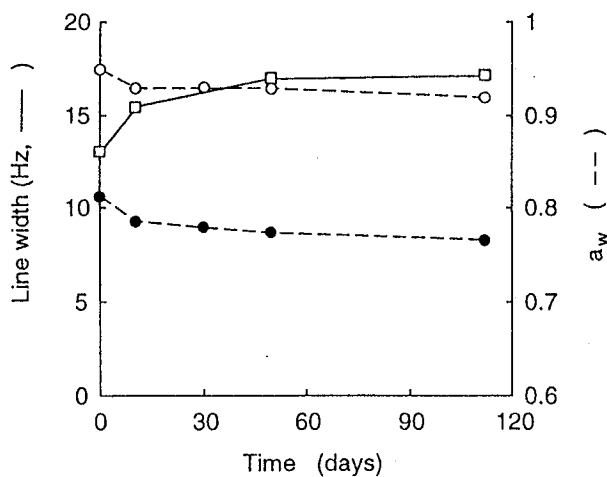


Fig. 12 Changes in line width of  $^{23}\text{Na}$  NMR signal and  $a_w$  of miso during fermentation.

Symbols:  $\square$ , line width (Hz) of miso extract;  $\circ$ ,  $a_w$  of miso extract;  $\bullet$ ,  $a_w$  of miso.

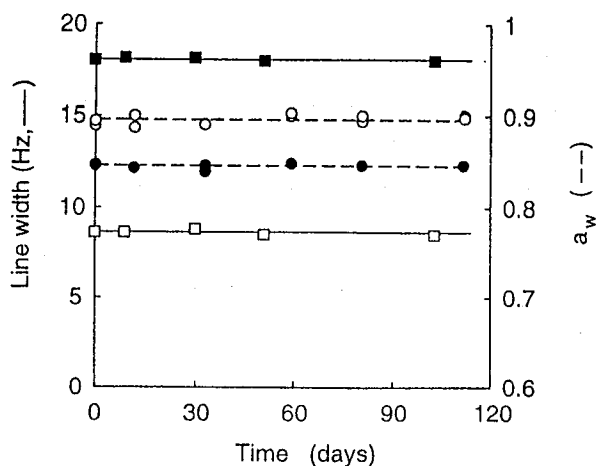


Fig. 13 Effect of storage time on line width of  $^{23}\text{Na}$  NMR signal and  $a_w$ .

Fifteen % NaCl solution (○ and □) and the miso model solution (pH 5.0, NaCl 15g, glucose 10g, casamino acid 10g, ethanol 2g, lactic acid 88% 0.23ml in 100 ml; ● and ■) were stored at 30°C and the line widths of their  $^{23}\text{Na}$  NMR signals (□ and ■) and  $a_w$  (○ and ●) were measured during storage.

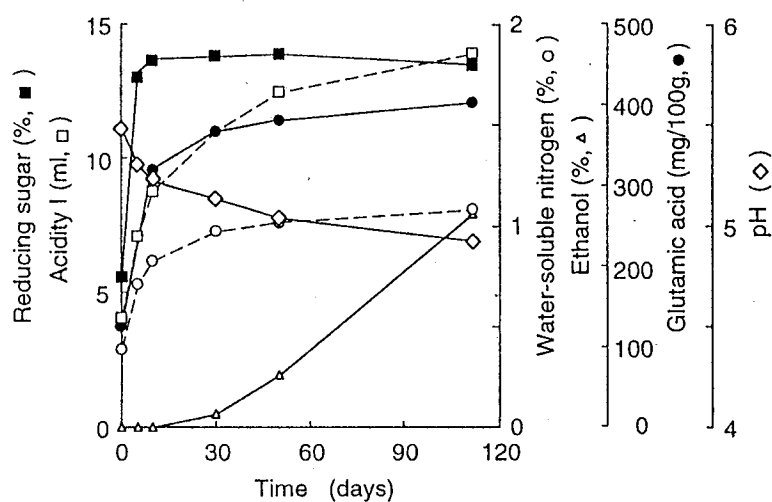


Fig. 14 Changes in chemical and physical characteristics of miso during fermentation.

The miso sample was fermented at 30°C for 80 days followed by incubation at 25°C. Symbols: ○, water-soluble nitrogen content (%); ●, glutamic acid content (mg/100g); △, ethanol content; ■, reducing sugar content (%); □, acidity I (ml); ◇, pH value.

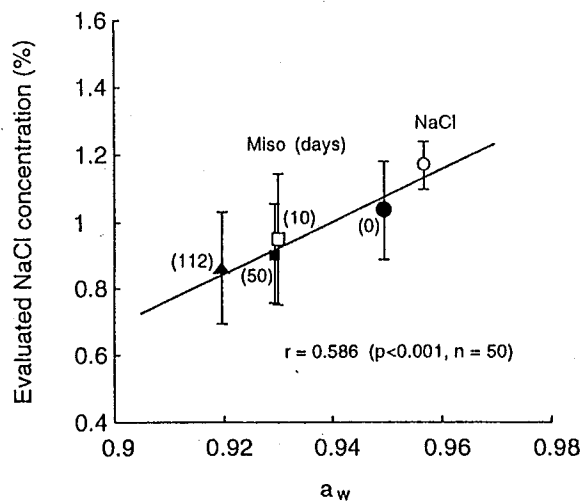
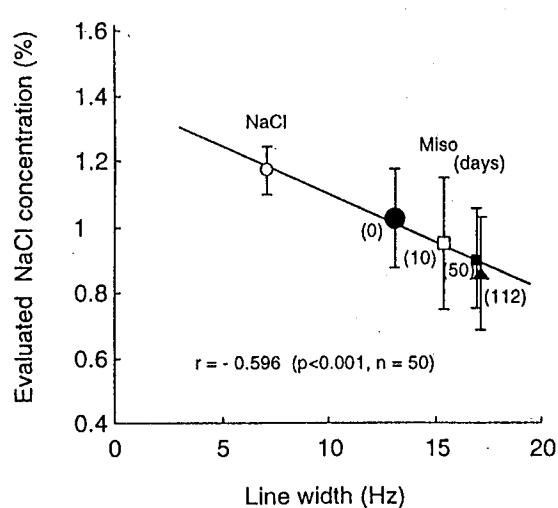


Fig. 15 Relationships between saltiness evaluated by sensory test, linewidth of  $^{23}\text{Na}$  NMR signal and  $a_w$ .

Symbols: ○, NaCl solution; ●, miso extract from the 0-day miso; □, miso extract from the 10-day miso; ■, miso extract from the 50-day miso; ▲, miso extract from the 112-day miso.

<i>S. cerevisiae</i>	1	TATCTGGT ATCTGGCA <u>NS1</u> →	AA AGATTAAGCC ATGCATGCT AAGTATAAGC AATTTATACA GTGAAACTGC GAATGGCTCA
<i>A. oryzae</i> ATCC 1011		NNNNNNNNNN NNNNNNNNN N NNN	-C- -T- -
<i>S. cerevisiae</i>	101	TTAATCAGT TATCGTTAT TTGATAGTTC CTTTACTACA TGGTATAACC GTGGTAATTC TAGAGCTAAT ACATGCTTAA AATCTCGACC CTTTGAAGA	-A- -C- -
<i>A. oryzae</i> ATCC 1011			-A- -C- -
<i>S. cerevisiae</i>	201	GATGTAITTA TTAGATAAAA AATCAATGTC *TTGG*ACTCT TTGATGATTC ATAATAACTT TTGGAATCC ATGGCCTTGT GCTGGCGATG GTTCATTCAA	-G- -C- -
<i>A. oryzae</i> ATCC 1011			-G- -C- -
<i>S. cerevisiae</i>	301	ATTCTGCCC TATCAACTTT CGATCGTAGC ATAGTGGCTT ACCATGGTTT CAACGGTAA CCGGAATAA GGG <u>N3</u> →	-T- -
<i>A. oryzae</i> ATCC 1011			-T- -
<i>S. cerevisiae</i>	401	ACGGCTAC <u>P2</u> ← CA CATCCAAGGA AGGCAGCA GG CGCGCAAAAT ACCCAATCCT AATTCAGGGA GGTAGTGACA ATAATAAGC ATACAGGCC CATTGGGTC	-C- -G- -
<i>A. oryzae</i> ATCC 1011			-C- -G- -
<i>S. cerevisiae</i>	501	TTGTAATGG AATGAGTACA ATGTAATAC CTTAAGCAGG AACAAATGGA GGG <u>N5</u> → CAAGTCT GGTGCCAGCA GCC	-C- -C- -
<i>A. oryzae</i> ATCC 1011			-C- -C- -
<i>S. cerevisiae</i>	601	ATTAAGTTG TTGAGTTAA AAAGCTCGTA GTTGAACITT GGGCCCGGTT GGGCCGTCGG ATTTT*CGT GTACTGGATT TCCACGGGG CCTTTCCTTC	-C- -T- -
<i>A. oryzae</i> ATCC 1011			-C- -T- -
<i>S. cerevisiae</i>	701	TGGCTAACCT TGAGTCTTG** TGGCTCTGG* CGAACCAGGA CTTTACTTIT GAAAAAATA GAGTGTCAA AGCAGGCGTA TTGCTGAAT ATATTAGCAT	-G- -G- -
<i>A. oryzae</i> ATCC 1011			-G- -G- -
<i>S. cerevisiae</i>	801	GGAATAATAG AATAGGACGT TTGGTCTTAT TTGTGTGTT TCTAGGACCA TGGTAATGAT TAATAGGAC GGTGGGGGCT ATCGGTATTC AATTGTC*GAG	-GC- -G- -
<i>A. oryzae</i> ATCC 1011			-GC- -G- -
<i>S. cerevisiae</i>	901	CTGAAATCT TGATTTATT GA <u>N7</u> → AGACTAAC TACTCGGAAA GC GTTTGCCA AGCAGCTTTT CGTTAATCAA* GAACGAAAGT TGAGCGATCT *****	-GC- -A- -
<i>A. oryzae</i> ATCC 1011			-GC- -A- -
<i>S. cerevisiae</i>	991	GATACCGT <u>P4</u> ← CG TAGTCTTAAC CATAAAT AT GCGCACTG**A TGGGTGGTG TTTTITTAAT GACCCACTCG GTACCTTACG AGAAATCAA GTCTTTGGGT	-GC- -C- -
<i>A. oryzae</i> ATCC 1011			-GC- -C- -
<i>S. cerevisiae</i>	1091	TCTGGGGGGA GTATGTGCG AAAGGCTGA <u>N9</u> → A ACTTAAAGGA ATTGACGGAA G GGCACCACT AGGAGTGGAG CTTGGGCT*A ATTGACTCA ACACGGGGAA	-A- -C- -
<i>A. oryzae</i> ATCC 1011			-A- -C- -
<i>S. cerevisiae</i>	1191	ACTCACCAGG TCCAGACACA ATAA <u>P6</u> ← GGATTG ACAGATTGAG AGCT CTTTCT TGATTTTGTG CGTGTGCTG CATGCCGTT TCTAGTTGG TCGAGTGATT	-A- -C- -
<i>A. oryzae</i> ATCC 1011			-A- -C- -
<i>S. cerevisiae</i>	1291	TGCTGCTTA ATTGGGATA CGAAGGAGAC CTTAAC*ATC TAAATAGTGG TGCTAGCATT TGCTGGTTAT CCACITCTTA GAGGGACTAT CGGTTCACAG	-CCG- -C- -
<i>A. oryzae</i> ATCC 1011			-CCG- -C- -
<i>S. cerevisiae</i>	1391	CCGATGGAAG TTT <u>N11</u> → GAGGCAA TAACAGGTCT GTGATGC CCT TAGAAGCTTC TGGGCGGCAC GCGGCTACA CTGAGGAGC CAGCGAGT*C*T AACCTTGGCC	-GC- -C- -
<i>A. oryzae</i> ATCC 1011			-GC- -C- -
<i>S. cerevisiae</i>	1491	GAGAGGTCTT GGTAA <u>P8</u> ← CTTG TGAAGTGG TCGTGC TGGG GATAGACCAT TGTAATTATT GCTCTTCAAC GAGGAATTC TAGTAAGCCG AAGTCATCAG	-CG- -T- -
<i>A. oryzae</i> ATCC 1011			-CG- -T- -
<i>S. cerevisiae</i>	1591	CTTGGCTTGA TTACGTCCTT GGCCTTTGTA CACACCGGCC GTGCTAGTA CCGATTGAAT GGCTTAGTGA GGCCTCAGGA TCTGCT*AGA GAAGGG*GGCA	-C- -T- -
<i>A. oryzae</i> ATCC 1011			-C- -T- -
<i>S. cerevisiae</i>	1691	ACTCATCTC AGAGCGGAGA A*TTTGGACAA ACTTGTCAT TTGGA <u>N13</u> → GGAAC TAAAGTGGT AACAGG TTT <u>P10</u> ← CCGTAGTGA ACCTGCGGA A GGATCATT	-GA- -C- -
<i>A. oryzae</i> ATCC 1011			-GA- -C- -
<i>A. oryzae</i> ATCC 1011			CGAGTGTAGG GTTCTAGCG AGCCCAACT CCCACCGTG TTTACTGTAC CTTAGTTGCT TGGGGGGCC CGCATTCAT GCGCGCGGG GGCTCTCAGC
<i>A. oryzae</i> ATCC 1011			CGCGGGCGCG CGCGCGCGCG AGACACCAG AACTCTGTCT GATCTAGTGA AGTCTGAGTT GATTGTATCG CAATCAGTTA AAACITTCAA CAATGGATCT
<i>A. oryzae</i> ATCC 1011			<u>ITS2</u> ← CTTGGTTCC G CATCGATGAA GACCGCAGC

Fig. 16 Alignment of the 18S rRNA gene sequences of *A. oryzae* ATCC 1011 and *S. cerevisiae* derived from 18S rRNA and PCR primers for amplification of rRNA genes.

The numbering system used was the *S. cerevisiae* sequencing numbering system described by Rubtsov *et al.*(1980). Dashes indicate nucleotides identical to that of *S. cerevisiae*; asterisks indicate that no bases were present at those positions; and "N " indicates unidentified bases. The arrowheads represent the 3' end of each primer. All odd-numbered primers are 5' primers; even numbers indicate 3' primers.

Table 3 Locations of base differences in test strains.

	Nucleotides at the following positions*											
	178	248	708	1035	1048	1057	1150	1348	1488	1499	1677	1703
<i>S. cerevisiae</i> **	T	T	C	G	A	C	T	A	G	T	T	A
<i>A. oryzae</i> ATCC 1011	A	T	C	G	G	C	A	G	G	C	C	G
<i>A. sojae</i> IFO 4386	A	T	C	G	G	C	A	G	G	C	C	G
<i>A. flavus</i> NFRI 1212	A	T	C	G	G	C	A	G	G	C	C	G
<i>A. parasiticus</i> NFRI 1153	A	T	C	G	G	C	A	G	G	C	C	G
<i>A. tamarai</i> JCM 2259	A	T	C	G	G	C	A	G	A	C	C	G
<i>A. niger</i> IFO 6341	G	A	T	A	T	T	C	A	G	T	T	A
<i>A. awamori</i> IFO 4033	G	A	T	A	T	T	C	A	G	T	T	A

\* Based on *S. cerevisiae* numbering<sup>135)</sup>.

\*\* Described by Rubtsov *et al* 132).

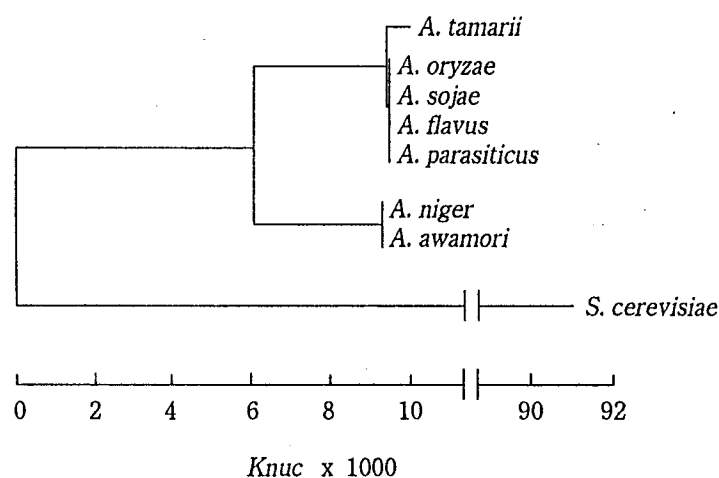


Fig. 17 Phylogenetic tree for *A. oryzae* ATCC 1011, *A. sojae* IFO 4386, *A. tamarai* JCM 2259, *A. niger* IFO 6341, *A. awamori* IFO 4033, *A. flavus* NFRI 1212 and *A. parasiticus* NFRI 1153.

The tree was calculated by the NJ method (Saitou and Nei, 1987) based on sequences of 1704 continuous nucleotides of 18S rRNA gene. *Knuc*, relative evolutionary distance, was calculated by Kimura's formula (Kimura, 1980). Sequence data of *S. cerevisiae* were from Rubtsov *et al.*(1980).

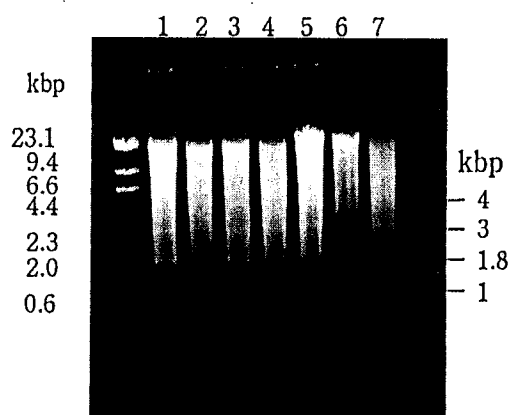


Fig. 18 *Sma*I restriction enzyme cleavage patterns of DNAs from *A. oryzae*, *A. flavus* and isolates.

Lanes 1-7 are *A. oryzae* IFO 4181, *A. flavus* NFRI 1212 and isolates RKG-1, RKG-2, RKG-3, RKG-4 and RKG-5, respectively. The sizes (in base pairs, left lane) are from a *Hind*III digest of  $\lambda$  DNA.

## 論文審査結果要旨

日本の伝統的発酵食品である味噌は、日本人の食生活における必須の調味料として存在してきたばかりではなく、近年日本人の健康で長寿を保つための主要な食糧として内外の注目をあびている食品である。動物実験の結果ではあるが、味噌食、醤油食はそれぞれ自然発生の腫瘍を約三分の一に減ずる効果をもち、また味噌は肝臓における解毒作用にかかわる主要酵素であるグルタチオン-S-転移酵素を著しく活性化する効果をもつ。このように味噌は生活に極めて密着し重要な食品であるにもかかわらず、味噌原料の多様なこと、醸造微生物とその酵素が多く複雑なこと、固相と液相における生化学反応、長期の熟成などの製造プロセスの複雑さのため、味噌醸造における原料成分の分解と熟成味噌成分形成への移行のメカニズムは不明なところが多いのが現状である。

本研究は味噌熟成中のタンパク質に焦点をあて、その動態を解析したものである。本研究は、タンパク質の動態解析にあたり、これまでほとんど研究が行われなかった味噌の不溶性タンパク質に注目した。味噌の不溶性タンパク質は米味噌の場合、仕込み直後に80%であり、熟成後の製品味噌になると約40%に減じた。その間の変化につき、味噌製造プロセスの原料大豆蒸煮条件、原料仕込配合条件、あるいは発酵・熟成条件を変化させた場合に不溶性タンパク質中のどの成分が如何に変化するか詳細な解析を加えた。

大豆タンパク質の米麴プロテアーゼによる分解は仕込み直後に急速に進み、熟成初期の水溶性窒素成分は著しく増加した。熟成後の水溶性画分は相対分子質量 (Mr) 10K以上のタンパク質はほとんど認められないことを明らかにした。一方、水不溶性画分として存在するタンパク質は5~20KのMrのものが味噌中に存在することを明らかにした。大豆タンパク質由来の11Sの塩基性サブユニットは熟成40日まで観察され、麴菌プロテアーゼ抵抗性であることを明らかにした。100℃の加熱処理は11Sタンパク質の分解を促した。味噌の官能検査の結果、100℃、2~3時間処理のものはテクスチャーの成績が良かった。米タンパク質は大豆タンパク質に比して、麴菌プロテアーゼにより分解されにくい。味噌中のタンパク質の12%を占める米に由来するタンパク質を解析すると、グルテリン画分の22-23Kタンパク質は麴菌プロテアーゼにより分解されにくいことを明らかにした。

味噌は発酵・熟成とともに塩辛さを減ずるいわゆる“塩なれ”現象を起こす。塩辛さと<sup>23</sup>NMRスペクトルの半値幅の増加および水分活性値の現象は味噌発酵熟成中のグルタミン酸などの水溶性物質の増加によるものであることを明らかにした。

味噌熟成中のスターターである麴菌、ならびに麴菌近縁の菌株について18SrRNA遺伝子 (rDNA) の塩基配列を解析し系統樹の作製を行った。また、ネパールの米麴マナ主要菌株の同定を行い *Aspergillus oryzae* と決定した。

以上、本研究は従来ほとんど未解決のまま残されていた味噌熟成中のタンパク質、ことに不溶性タンパク質の動態解析と麴菌に関し研究を行ったもので、審査員一同本研究者に博士 (農学) の学位を授与するのに値するものと認定した。